Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. E. Helmreich

Stabilitätsverhalten von an Sepharose immobilisierter Hefe-Alkoholdehydrogenase in Abhängigkeit von Temperatur, pH und Ionenstärke

INAUGURAL-DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ulrich Freise
aus Regensburg

Würzburg, den 9. Juni 1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0079

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der
Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. E. Helmreich

Stabilitätsverhalten von an Sepharose immobilisierter Hefe-Alkoholdehydrogenase in Abhängigkeit von Temperatur, pH und Ionenstärke

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ulrich Freise
aus Regensburg

Würzburg, den 9. Juni 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. D. Palm

Korreferent: Prof. Dr. med. U. Trendelenburg

Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juli 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung .	1
2.	Methoden	4
2.1.	Chemikalien und Hilfsmittel	4
2.1.1.	Chemikalien	4
2.1.1.1.	Eigenschaften der nativen ADH	4
2.1.1.1.1.	Daten der Hefe-ADH	5
2.1.1.1.2.	Reaktionsbedingungen	7
2.1.2.	Geräte	8
2.1.3.	Herstellung der Pyrophosphatpuffer A bis Z	8
2.1.3.1.	Beschreibung der Herstellung	8
2.1.3.2.	Berechnung der gewünschten Ionenstärke	9
2.1.4.	Herstellung der Substratlösung	11
2.1.4.1.	Zusammensetzung	11
2.1.4.2.	Pyrophosphat/Glycin-Puffer	11
2.1.4.3.	Semicarbazid-Lösung	11
2.1.4.4.	NAD-Lösung	11
2.1.4.5.	GSH-Lösung	11
2.1.4.6.	Albumin-Lösung	12
2.1.5.	Immobilisierung der ADH	12
2.1.5.1.	Aktivierung der Sepharose	12
2.1.5.2.	Bindung der ADH	12
2.1.6.	Herstellung der Meßsäulchen	13
2.2.	Versuch	13
2.2.1.	Versuchsaufbau	13
2.2.2.	Versuchsdurchführung	15
2.2.3.	Erstellung der Eichgeraden	16
2.2.4.	Auswertung des Einzelversuchs	16

		Seite
3.	Ergebnisse	18
3.1.	Versuchsreihen	18
3.1.1.	Auswertung der Versuchsreihen	18
3.1.2.	Halbwertszeiten der einzelnen Versuchsreihen	21
3.2.	pH-Abhängigkeit der Halbwertszeiten	21
3.2.1.	Ermittelung der pH-Optima	21
3.2.2.	pH-Optima in Abhängigkeit von Ionenstärke und Temperatur	26
3.3.	pH-Optimum-Halbwertszeiten im Vergleich zu Temperatur und Ionenstärke	29
3.3.1.	pH-Optimum-Halbwertszeiten bei Änderung der Ionenstärke und konstanter Temperatur	29
3.3.2.	Temperaturverlauf der pH-Optimumshalbwertszeiten bei konstanter Ionenstärke	32
3.4.	Einfluß der Ionenart auf die Stabilität	32
3.5.	Betriebsstabilität	33
4.	Diskussion	34
5.	Zusammenfassung	38
6.	Literaturverzeichnis	39

1. Einleitung

Um sich über den Sinn und Zweck dieser Arbeit etwas Klarheit zu verschaffen, ist es notwendig, sich die Bedeutung von Enzymen im allgemeinen vor Augen zu führen und zwar für Forschung und Technik, Analytik und die pharmazeutische Industrie, sowie für den Endverbraucher im medizinischen und wirtschaftlichen Bereich (1 ; 2).

Jede lebende Zelle enthält eine Vielzahl verschiedenartiger Enzyme, ohne die sie nicht lebensfähig wäre. Enzyme sind Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 10^4 bis 10^6, mit einer bestimmten Primär-, Sekundär-, Tertiär- und sehr oft auch einer Quartärstruktur, die ihre Funktion erst ermöglichen. So sind sie als Katalysatoren für bestimmte Reaktionen verantwortlich und zwar in einem sehr engen substrat-produktspezifischen Bereich. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, eine bestimmte Reaktion gezielt ablaufen zu lassen, natürlich aber nur bis zur Einstellung des substrat-produktspezifischen Gleichgewichts. Diese Spezifität kann in so hohem Maße ausgeprägt sein, daß sogar links- von rechtsdrehenden Isomeren unterschieden werden, und es dadurch möglich ist, in einem Racemat nur die eine Komponente umzusetzen. Dies wird durch deren sterische Anordnung und der damit verbundenen Ladungsverteilung im Enzym, entsprechend einer Schlüssel-Schloß-Beziehung, erreicht. Es ist also möglich, bestimmte Produkte gezielt entstehen zu lassen, die dann mit geeigneten Methoden aufgereinigt werden können. Da aber Enzyme, entsprechend ihrer katalytischen Funktion,

nicht verbraucht werden und demnach theoretisch immer wieder zu verwenden wären, bietet es sich an, sie an zweckmäßige Trägersubstanzen zu fixieren, das Substrat darüberzuleiten und nur das Eluat aufzureinigen, ohne dabei das Enzym zu zerstören. Dies bietet verschiedene Vorteile. Einmal ist es sehr kostensparend, da Enzyme selbst erst aus Zellmaterial von Tieren, Pflanzen, Bakterien oder Pilzen gewonnen und anschließend aufgereinigt werden müssen, zum anderen ist das Eluat, sofern es im medizinischen Bereich Anwendung finden soll, in bezug auf das Enzymeiweiß bereits pyrogen- bzw. allergenfrei. Bereits jetzt finden immobilisierte Enzyme umfangreiche medizinische Anwendung in Form von Teststäbchen, mit deren Hilfe z.B. Glucose, Harnstoff, Aceton, usw. durch gekoppelte Farbreaktionen einfach und schnell qualitativ und mit einer gewissen Fehlerbreite auch quantitativ nachgewiesen werden kann. In den meisten Fällen handelt es sich um eine einmalige Anwendung eines isolierten, immobilisierten Enzyms.

Leider ist auch die Lebensdauer des Enzyms nicht unbegrenzt, sondern unterliegt vielmehr verschiedenen äußeren Einflüssen, die eventuell nur Minimalveränderungen am Enzym hervorrufen und bereits zum Aktivitätsverlußt führen können. So spielt der pH, die Temperatur und die Konzentration verschiedener anderer Substanzen in dem umgebenden Milieu eine entscheidende Rolle, sowie Oxydations- und mikrobielle Digestionsvorgänge.

Die vorliegende Arbeit setzt sich zur Aufgabe, die oben erwähnten Abhängigkeiten in bezug auf die Stabilität zu

untersuchen, speziell für Enzyme mit zwei Substraten (Substrat plus Coenzym), am Beispiel der an Sepharose gebundenen Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe, und dabei eventuell sich abzeichnende Gesetzmäßigkeiten aufzudecken.

2. Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien und Hilfsmittel

2.1.1. Chemikalien

Äthanol (99,9%ig)
Albumin (aus Rinderserum)
Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Hefe (Fa. Boehringer)
Ammoniumsulfat (2M, mit Ammoniak auf pH 7,4 titriert)
Bromcyan (BrCN)
Dioxan
Glutathion (GSH)
Glycin
Mercaptoäthanol (1M)
Natriumazid (NaN_3)
Natriumchlorid
Natriumhydroxyd (2M und 5M)
tetra-Natriumpyrophosphat ($Na_4P_2O_7 \cdot 1o\ H_2O$)
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+)
Salzsäure (2M)
Semicarbazid
Sepharose 4B
Sodiumdodecylsulfat (SDS) (o,1%ig)

2.1.1.1. Eigenschaften der nativen ADH (3 ; 4)

Die ADH ist ein Enzym, das sowohl in Tieren, Bakterien, als auch in Pilzen gefunden wurde. Die Rolle, die sie im

tierischen hepatischen Stoffwechsel besitzt, ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. So könnte ihr eine Entgiftungsfunktion zukommen, um z.B. bei Wiederkäuern den bei der Gärung im Magen-Darm-Trakt anfallenden Alkohol aus dem Körper zu nehmen. Andererseits wird ihr aber auch eine Funktion im Steroidstoffwechsel zugesprochen. Gesichert ist ihr Mitwirken im Fruktosestoffwechsel, nämlich bei der Reduktion von D-Glycerinaldehyd zu Glycerin. In Bakterien vermittelt sie die abschließende Reaktion der anaeroben Glykolyse, d.h. hier wird der Alkohol nicht abgebaut, sondern gebildet, um das Coenzym NADH wieder in die oxidierte Form zu bringen.

Was die Substratspezifität der ADH betrifft, so ist diese nicht sehr hoch, jedoch bei der Hefe-ADH ausgeprägter als bei der tierischen. Es werden alle geradkettigen primären Alkohole außer Methanol gut abgebaut, aber die Reaktivität nimmt hier mit zunehmender Kettenlänge ab. Schlecht bis sehr schlecht werden z.B. verzweigtkettige und sekundäre Alkohole, Polyalkohole, Hydroxysäuren, Aminoalkohole, etc. umgesetzt. Vorbedingung ist aber in jedem Fall, daß ein Isomer in R-Konfiguration, bei primären Alkoholen ein prochirales Zentrum vorliegt.

2.1.1.1.1. Daten der Hefe-ADH

Sie ist ein zytoplasmatisches Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 14o.ooo bis 15o.ooo, das nach bekannten Präparationsvorschriften (5) gewonnen und in 5o%-gesättigter Ammoniumsulfatlösung bei -2o°C gelagert wird .

Hefe-ADH ist ein Tetramer, bestehend aus vier gleichen Untereinheiten mit Molekulargewichten von je 36.ooo bis 37.ooo. Bereits über die Hälfte des Moleküls ist schon in seiner Sequenz aufgeschlüsselt. Versuche ergaben auch, daß etwa 8 bis 9 SH-Gruppen pro Untereinheit vorhanden sind, die einen großen Anteil an der Aufrechterhaltung der Quartärstruktur besitzen. Deshalb wurde auch der Substratlösung Glutathion, bzw. dem Lagerpuffer Mercaptoäthanol zugesetzt. Weiterhin ist bekannt, daß ein Molekül ADH vier Moleküle NAD^+ bindet, also ein Molekül NAD^+ pro Untereinheit. Unerläßlich für die Aktivität der ADH sind außerdem noch Zn-Ionen, wobei 4 bis 5 von ihnen auf ein Molekül ADH, bzw. etwa eines pro Untereinheit kommen. Diese sind so fest gebunden, daß sie nicht einmal mit EDTA entfernt werden können. Andererseits ist es aber möglich weitere Zn-Ionen anzulagern, bis zu einer Gesamtzahl von etwa 3o pro Molekül ADH.

Der isoelektrische Punkt der nativen ADH wird mit 5,4 angegeben und ihr stabiler Bereich zwischen pH 6 und pH 8,5.

Die Firma Boehringer bietet in ihrer Preisliste 1978/79 zwei Formen der Hefe-ADH an und benennt dabei folgende Stabilitäten:

a) Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat, pH 6; bei $+4^oC$ in 6 Monaten bis zu 4o% Aktivitätsverlust

b) Lyophilisat; bei $+4^oC$ in 6 Monaten bis zu 1o% Aktivitätsabnahme; nach Auflösung in aqua bidest. (pH 7,5) bei $+4^oC$ etwa eine Woche haltbar.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das ADH-Lyophilisat verwendet.

2.1.1.1.2. Reaktionsbedingungen

Die Alkoholdehydrogenase katalysiert zusammen mit ihrem Coenzym NAD^+ folgende Reaktion:

$$\begin{matrix} R1 \\ R2 \end{matrix}\!\!>\!CHOH + NAD^+ \xrightleftharpoons{ADH} \begin{matrix} R1 \\ R2 \end{matrix}\!\!>\!CO + NADH + H^+$$

Betrachtet man sich die Gleichgewichtskonstante k_{eq} für Äthanol (3) bei pH 7 bis 1o, 2o°C und μ = o,1 :

$$k_{eq} = \frac{(NADH)(H^+)(CH_3CHO)}{(NAD^+)(CH_3CH_2OH)} \approx 8 \times 1o^{-12}\ M\ ,$$

so erkennt man daraus, daß der Schwerpunkt ganz auf der Seite des Äthanols liegt. Die Reaktion in Richtung des Aldehyds wird durch Erhöhung des pH entsprechend begünstigt. Dem ist aber wegen der Zerstörung der ADH im oberen alkalischen Bereich Grenzen gesetzt, und so wurde die Reaktion auf einen pH 9 standardisiert. Durch den Zusatz von Semicarbazid als Aldehydfänger wird es aber erst möglich, die Reaktion in der gewünschten Richtung quantitativ ablaufen zu lassen. Durch die völlige Substratsättigung des Enzyms, wie dies im Testansatz der Fall ist, ist es nun möglich, die Aktivität der ADH zu bestimmen.

Für die vorliegende Arbeit war es nicht von Interesse, die absolute Höhe der Aktivität zu kennen, sondern nur die relative im Vergleich zur Anfangsaktivität, und so wurde auf deren Berechnung verzichtet und nur die Extinktionsänderung als Maß der Produktbildung mit der zugehörigen Zeit tabellarisch erfaßt. Ausschließlich die sich

hieraus ergebenden Halbwertszeiten wurden dann in die Arbeit übernommen (Tabelle 2).

2.1.2. Geräte

Brutschränke (25°C, 37°C, 5o°C)
Durchflußphotometer (ISCO)
Kompensationsschreiber (Hitachi)
Kühlschrank (4°C)
Magnetrührer
Pasteurpipetten als Reaktionssäulen
Peristaltikpumpe mit 4-fach Kopf (Minipuls)
pH-Meter
Wasserbad (25°C)
Schläuche, Gefäße, etc. nach Versuchsaufbau

2.1.3. Herstellung der Pyrophosphatpuffer A bis Z

2.1.3.1. Beschreibung der Herstellung

Da die Abhängigkeit von pH, Ionenstärke und Art des verwendeten Ions untersucht werden soll, wurden verschiedene Puffer hergestellt und mit großen lateinischen Buchstaben gekennzeichnet. Tabelle 1 gibt über die einzelnen Charakteristika Auskunft. Es wurde die errechnete (s.u.) Menge an Pyrophosphat und NaCl abgewogen, in aqua bidest. aufgelöst und mit 2M HCl auf den gewünschten pH titriert, sodaß jetzt die geforderte Ionenstärke vorlag. Um mikrobielle Einflüsse zu unterdrücken, wurden sie mit Natrium-

azid versetzt.

2.1.3.2. Berechnung der gewünschten Ionenstärke

Benötigte Formeln:

Ionenstärke: $\mu = \frac{1}{2}\sum(m\, z^2)$

m = Molarität der einzelnen Ionen

z = Ladung " " "

Hendersen-Hasselbalch'sche Gleichung:

$$pH = pk_a + lg \frac{(A^-)}{(HA)} \quad ;$$

pk_a-Werte für Natriumpyrophosphat:

$Na_3HP_2O_7$ / $Na_4P_2O_7$: $pk_{a4} = 8,44$

$Na_2H_2P_2O_7$ / $Na_3HP_2O_7$: $pk_{a3} = 6,54$

Da man wissen möchte, wieviel tetra-Natriumpyrophosphat eingewogen werden muß, um die gewünschte Ionenstärke zu erhalten, müssen die Gleichungen entsprechend symbolisiert und umgeformt werden. Die Titration mit HCl muß natürlich berücksichtigt werden, d.h. für jedes entstehende $HP_2O_7^{3-}$- bzw. $H_2P_2O_7^{2-}$-Ion entstehen ein bzw. zwei Cl^--Ionen.

Abkürzungen: m_0 = Molarität für $Na_4P_2O_7$ (≙ Einwaage)

m_4 = " " $P_2O_7^{4-}$

m_3 = " " $HP_2O_7^{3-}$

m_2 = " " $H_2P_2O_7^{2-}$

Berechnung:

$\mu = \frac{1}{2}\sum(m\, z^2)$, also

$$2\mu = \underset{(Na^+)}{4m_o + 16m_4 + 9m_3 + 4m_2} + \underset{(Cl^-)}{m_3 + 2m_2} =$$

$$= 4m_o + 16m_4 + 1om_3 + 6m_2 \quad ; \qquad (Gl.I)$$

$$m_3 = m_2 \cdot 1o^{pH-pk_{a3}} \quad ; \qquad (Gl.II)$$

$$m_4 = m_3 \cdot 1o^{pH-pk_{a4}} = m_2 \cdot 1o^{2pH-pk_{a4}-pk_{a3}} \quad ; \quad (Gl.III)$$

$$m_o = m_4 + m_3 + m_2 = m_2(1 + 1o^{pH-pk_{a3}} + 1o^{2pH-pk_{a4}-pk_{a3}}); \quad (Gl.IV)$$

Durch entsprechendes Einsetzen und Umformen erhält man dann die Gleichung:

$$m_o = \frac{(\ 1 + 1o^{pH-pk_{a3}} + 1o^{2pH-pk_{a4}-pk_{a3}}\ ) \cdot \mu}{1o \cdot 1o^{2pH-pk_{a4}-pk_{a3}} + 7 \cdot 1o^{pH-pk_{a3}} + 5} \quad ;$$

Aus den Molaritäten in Tabelle 1 läßt sich bei einem MG ($Na_4P_2O_7 \cdot 1o\ H_2O$) von 446,o6 die Einwaage berechnen.

pH μ	1o	9	8	7
o,1	A=o,o1o1	G=o,o1o7	N=o,o129	U=o,o152
o,2	B=o,o2o2	H=o,o214	O=o,o259	V=o,o3o4
o,4	C=o,o4o3	I=o,o428	P=o,o517	W=o,o6o8
o,8	D=o,o8o6	K=o,o856	R=o,1o35	X=o,1216
1,2	-	-	S=o,1552	Y=o,1824
1,6	E=o,1613	L=o,1711	-	-
1,2 (o,4+o,8 NaCl)	-	-	T=o,o517 (+ o,8)	Z=o,o6o8 (+ o,8)
1,6 (o,4+1,2 NaCl)(+1,2)	F=o,o4o3	M=o,o428 (+ 1,2)	-	-

Tabelle 1: Molaritäten der Pyrophosphatpuffer A bis Z

2.1.4. Herstellung der Substratlösung

2.1.4.1. Zusammensetzung (bezogen auf 3 ml)

a) 2,57 ml Glycin/Pyrophosphatpuffer (75mM/pH 9)
b) o,1o ml Semicarbazid-Lösung (2,2M)
c) o,1o ml Äthanol (99,9%ig)
d) o,2o ml NAD-Lösung (o,o3M)
e) o,o1 ml GSH-Lösung (o,3M)
f) o,o2 ml Albumin-Lösung (o,1%ig)

2.1.4.2. Glycin/Pyrophosphatpuffer

Einwaage: 1o g Pyrophosphat • 1o H_2O
o,5 g Glycin

Mit aqua bidest. auf 3oo ml auffüllen und auf pH 9 titrieren.

2.1.4.3. Semicarbazid-Lösung

5 g Semicarbazid in 1o ml 2M NaOH auflösen, mit 5M NaOH auf einen pH von 6,3 bis 6,5 einstellen und mit aqua bidest. auf 2o ml auffüllen.

2.1.4.4. NAD-Lösung

2o mg wasserfreies NAD^+ in 1 ml aqua bidest. auflösen.

2.1.4.5. GSH-Lösung

9o mg GSH in 1 ml aqua bidest. auflösen.

2.1.4.6. Albumin-Lösung

Zu Vergleichszwecken mit der Testung von nativer ADH wurde auch für die vorliegende Arbeit Rinderserumalbumin in entsprechender Konzentration (o,1%ig) in die Substratlösung eingebracht. Das Albumin übt dabei eindeutig (6) einen stabilisierenden Effekt auf gelöste ADH aus.

2.1.5. Immobilisierung der ADH

Die Immobilisierung wurde in Anlehnung an der von AXEN und ERNBACK beschriebenen Methode durchgeführt (1 ; 7).

2.1.5.1. Aktivierung der Sepharose

8 g filtertrockene Sepharose 4B wurde mit 12 ml Puffer D versetzt,das ergab ein Gesamtvolumen von 2o ml. Dann wurden o,4 g Bromcyan in 16 ml Dioxanlösung (o,5 ml Dioxan plus 15,5 ml aqua bidest.) aufgelöst. Nachdem man nun die Sepharose mit der Bromcyanlösung versetzt hat, wurde die Aufschwemmung unter ständigem Rühren mit Hilfe von 2M NaOH auf einem pH um 1o,5 gehalten. Ändert sich der pH nicht mehr, so gilt die Aktivierungsreaktion als abgeschlossen. Anschließend wurde die aktivierte Sepharose mit reichlich (5oo ml) aqua bidest. unter ständigem Abfiltrieren gewaschen, danach mit etwa 25o ml Puffer K.

2.1.5.2. Bindung der ADH

Die filtertrockene aktivierte Sepharose wurde dann in

12 ml Puffer K aufgeschwemmt und mit 1oo mg Hefe-ADH versetzt. Das so entstandene Verhältnis von 12,5 mg Enzym zu 1 g Sepharose gewährleistet einen optimalen, sich selbst stabilisierenden Effekt (6). Die Immobilisation wurde unter ständiger leichter Rotation bei +4°C für 24 Std. durchgeführt. Sodann wurde erneut unter Abfiltration mit folgenden Lösungen gewaschen:

a) 25o ml Puffer K

b) 25o ml Glycin/PP-Puffer (s. 2.1.4.2.)

c) 25o ml Puffer T

d) 25o ml 2M Ammoniumsulfat (s. 2.1.1.)

Die filtertrockene immobilisierte ADH wurde in 8 ml 2M Ammoniumsulfatlösung (s. 2.1.1.) suspendiert und bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

2.1.6. Herstellung der Meßsäulchen

Als Reaktionssäulen dienten kurze Pasteurpipetten, die mit Filterwatte abgedichtet und mit einer Sepharosesuspension (ein Teil gequollene Sepharose zu einem Teil aqua bidest.) von o,4 ml beschickt wurden. Ein Zusatz von etwa 11 µl der immobilisierten ADH ergab unter den Versuchsbedingungen eine brauchbare Extinktionsänderung von ca. 1,o.

2.2. Versuch

2.2.1. Versuchsaufbau

Aus der Schemazeichnung (Abb.1) ist ersichtlich, daß die

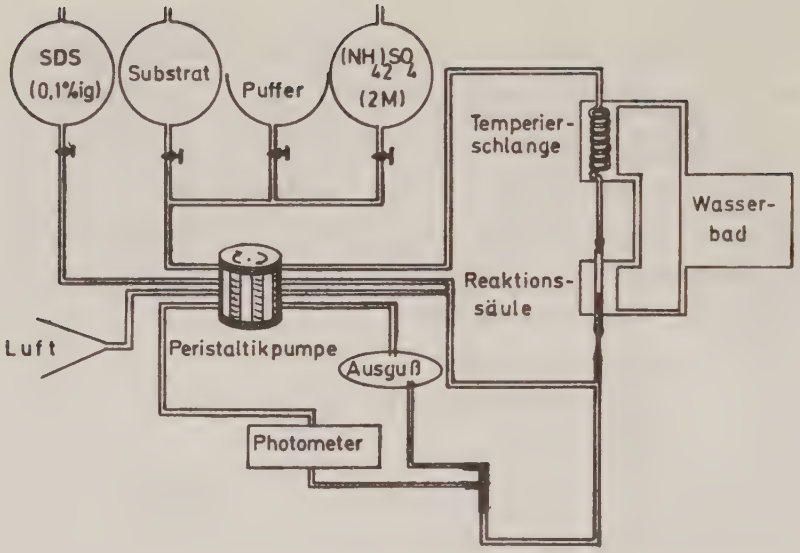

Abb.1: Versuchsaufbau (Schemazeichnung)

Reaktionssäulchen mit drei verschiedenen Flüssigkeiten durchströmt werden können, mit Ammoniumsulfat, Substrat und dem für die Säule charakteristischen Pyrophosphatpuffer. Zuvor werden sie mit Hilfe einer Temperierschlange auf die erforderliche Meßtemperatur von 25°C gebracht. Auch die Reaktionssäule selbst wird durch umspülendes Wasser konstant auf dieser Temperatur gehalten. Um störende Einflüsse durch etwaige Turbulenzen und Vermischungen weitgehend auszuschalten, wurden unmittelbar hinter der Säule Luftbläschen in das Schlauchsystem eingepumpt, und zwar im ungefähren Verhältnis von zwei Teilen Luft zu einem Teil Flüssigkeit. Um die Schläuche und die Meßzelle sauber zu halten, wurde zusammen mit der Luft eine o,1%ige SDS-Lösung eingepumpt. Dabei wurde das Eluat im Verhältnis

1,33 Teile Eluat plus o,33 Teile SDS um den Faktor 1,25 verdünnt. Blasenfreiheit in der Durchflußküvette wurde dadurch erreicht, daß man nicht die 1,66 Teile Flüssigkeit plus die insufflierte Luft hindurchleitete, sondern nur 1,33 Teile Flüssigkeit, und den Rest kurz vor Eintritt in die Meßkammer (Flußrichtung von unten nach oben!) mit Hilfe eines eigens für diesen Zweck konstruierten F-Stückes nach oben ableitete. Dies wird dadurch möglich, indem man z.B., wie es hier der Fall ist, das gleiche Volumen, das man durch die Säule drückt, auch durch die Küvette zieht.

2.2.2. Versuchsdurchführung

Nach Einbringen der Säule in das System wurde diese etwa zwei Minuten lang bei Stellung 1ooo der Peristaltikpumpe mit 2M Ammoniumsulfat durchgespült. Dies bewirkte dreierlei, einmal das Erreichen der erforderlichen Meßtemperatur von 25°C, zum anderen die Einstellung der Nullinie, und drittens, das Auswaschen des Mercaptoäthanols (s.u.). Dann wurde auf Stellung 5oo zurückgedreht und auf Substratdurchfluß geschaltet. Dies entsprach einer Durchflußrate von 1,33 ml/min. Nach sieben Minuten wurde auf Puffer umgestellt und bei Stellung 1ooo 5 ml hindurchgeleitet. Um oxydative Vorgänge bei der Lagerung weitgehend zu verhindern, wurde dieser vorher mit 4o µl einer 1M Mercaptoäthanollösung versetzt. Dies entspricht einer Endverdünnung auf etwa 8mM. Anschließend wurde die Säule in den entsprechenden Temperaturbereich zurückgestellt.

Mercaptoäthanol besitzt zwar einen stabilisierenden Ef-

fekt, würde aber, da es selbst eine gewisse Affinität als Substrat besitzt, unter Reaktionsbedingungen einen Inhibitor darstellen (8). Deshalb kann es auch nur zur Lagerung verwendet werden und muß vor der Messung wieder gründlich entfernt werden.

2.2.3. Erstellung der Eichgeraden

Sowohl die Versuchsanordnung, als auch das Meßverfahren bedingen, daß die Extinktion nicht linear ansteigt, sondern vielmehr nach einem S-förmigen Anstieg in ein Plateau bestimmter Höhe asymptotisch übergeht. Dieses wäre aber erst nach etwa dreißig Minuten erreicht. Um nun den Versuch abzukürzen, wurde nach Charakteristika im Anfangsteil der Kurve gesucht. So wurde gefunden, daß der Extinktionswert P_4, das ist der Wert, den die Kurve vier Minuten nach Beginn des Anstiegs erreicht hat, sehr gut mit dem sich einstellenden Plateau korreliert. In einer Meßreihe von fünfzehn Kurven im Extinktionsbereich von o,o8o bis o,82o (vergl. Abb.2) wurde eine Eichgerade erstellt, die folgende Eigenschaften zeigte: Abszisse = E, Ordinate = P_4; Steigung = o,865, Schnittpunkt mit der y-Achse bei o,oo4, Korrelation von o,999.

Ferner galt es noch zu berücksichtigen, daß der Wechsel von Ammoniumsulfat auf Substrat eine positive Extinktionsänderung von o,o3 ergab.

2.2.4. Auswertung des Einzelversuchs

Nach Erhalt der Meßkurve wurde der P_4-Wert ermittelt,

an Hand der in einen Rechner eingebrachten Eichkurve das zu erwartende Plateau errechnet, davon die Korrektur von o,o3 abgezogen und dieser Wert in die entsprechende Tabelle eingetragen.

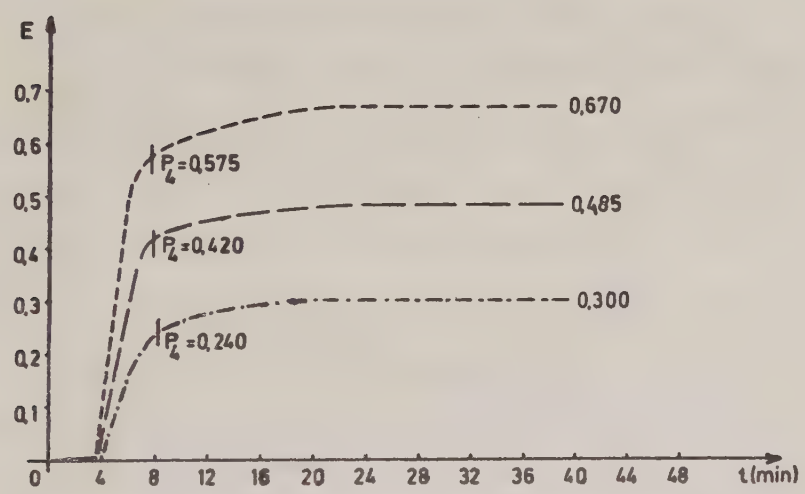

Abb.2: Typische Kurvenverläufe verschiedener Höhe

3. Ergebnisse

3.1. Versuchsreihen

3.1.1. Auswertung der Versuchsreihen

Es wurden 96 Versuchsreihen durchgeführt, deren Bezeichnungen Folgendes besagen: der Großbuchstabe gibt den jeweiligen Puffer an, der zur Lagerung verwendet wurde (Zusammensetzung s. 2.1.3.), die Zahl dahinter, die Lagertemperatur; dabei bedeutet 1=50°C, 2=37°C, 3=25°C und 4=4°C.

Trägt man die einzelnen Meßergebnisse einer Versuchsreihe auf ein halblogarithmisches Koordinatenpapier auf, so erhält man im wesentlichen zwei Kurventypen (Abb.3 und 4), die durchaus miteinander in Einklang gebracht werden können. So ist die Kurve in Abb.3 als Ergebnis der Überlagerung mindestens dreier Mechanismen bzw. Funktionen zu verstehen. Im Anfangsteil erfolgt eine viel raschere Inaktivierung als im Mittelteil, der den weitaus größten Anteil der Kurve besitzt und bei halblogarithmischer Auftragung eine Gerade ergibt. Im Endteil erfolgt erneut eine rasche Inaktivierung.

Nun ist es aber von den Lagerungsbedingungen und von der Zeit, d.h. bis zu welchem Prozentsatz man den Kurvenverlauf verfolgt, abhängig, wie sehr sich der Anfangs- bzw. der Endteil in der Kurve niederschlägt. Deshalb ist bei sehr kurzem bzw. langem Anfangsteil kein Übergang in den Mittelteil mehr feststellbar, und es resultiert eine Kurve wie in Abb.4, die streng exponentiell abfällt, bzw. bei diesem Auftragungsmodus eine Gerade ergibt.

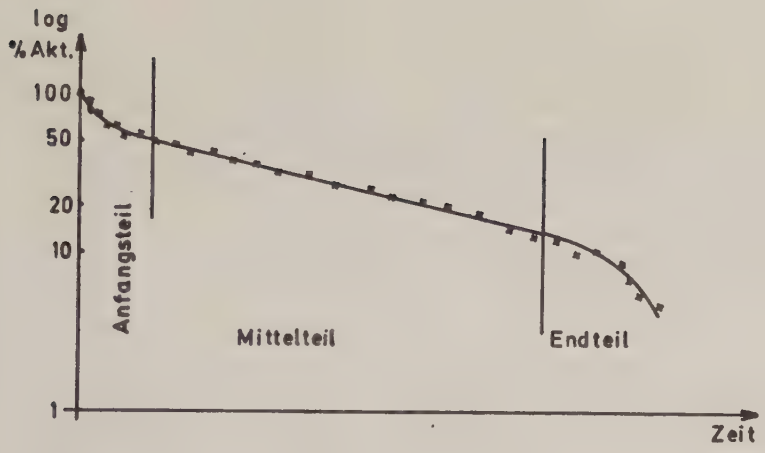

Abb.3 (s. Text)

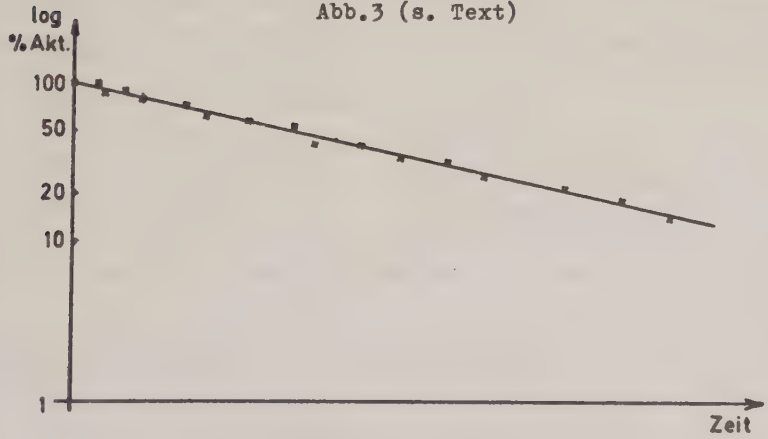

Abb.4 (s. Text)

Aus einem Kurvenverlauf wie in Abb.4 ist es leicht möglich, die Halbwertszeit zu ermitteln und in die Tabelle 2 einzutragen. Im Falle eines Verlaufs wie in Abb.3 wurde aus Vergleichszwecken eine gemittelte Halbwertszeit errechnet, die den Mittelwert aus der Halbwertszeit des linearen Mittelteils und der Halbwertszeit, berechnet aus allen Meßpunkten, darstellt. Bei sehr steilem und prozen-

Puffer	Temperaturbereiche 1 (5o°C)			2 (37°C)			3 (25°C)			4 (4°C)		
A	o,28	o,35	o,32	2,41	3,88	3,15	67,o	99,8	83,4	663	3569	2116
B	o,19	--	o,19	2,3o	3,36	2,83	27,2	82,4	54,8	141	217	179
pH C	o,18	--	o,18	2,81	3,84	3,33	28,7	84,3	56,5	156	389	273
1o D	o,22	--	o,22	2,79	3,89	3,34	35,8	61,3	48,6	154	337	246
E	o,17	--	o,17	4,o1	5,24	4,63	52,3	81,7	67,o	912	1966	1439
F	1,18	1,6o	1,39	26,1	32,8	29,5	259	259	259	29o2	2959	2931
G	o,94	2,26	1,6o	11,o	14,9	13,o	1o1	112	1o7	1o27	2o88	1558
H	o,71	1,79	1,25	1o,6	13,5	12,1	145	176	161	1339	243o	1885
pH I	o,79	2,o5	1,42	1o,3	13,3	11,8	95,5	115	1o5	1242	1694	1468
9 K	o,98	1,82	1,4o	15,7	19,5	17,6	162	24o	2o1	2o15	246o	2238
L	1,23	2,oo	1,62	17,8	26,6	22,2	2o6	2o6	2o6	2o97	3166	2632
M	1,39	1,92	1,66	37,1	54,6	45,9	536	1228	882	4682	1o577	763o
N	2,11	2,68	2,4o	23,7	3o,6	27,2	98,o	98,o	98,o	879	879	879
O	1,93	1,93	1,93	23,3	23,3	23,3	82,7	82,7	82,7	621	855	738
pH P	2,86	2,86	2,86	27,5	31,8	29,7	112	112	112	1o53	1o53	1o53
8 R	2,57	2,57	2,57	29,6	29,6	29,6	13o	13o	13o	1329	19o6	1618
S	2,45	2,45	2,45	27,5	27,5	27,5	1o4	131	118	1184	1732	1458
T	2,63	2,63	2,63	45,o	45,o	45,o	194	22o	2o7	1o74	1o74	1o74
U	5,98	5,98	5,98	37,2	4o,8	39,o	59,7	67,3	63,5	155	155	155
V	3,97	3,97	3,97	21,8	25,9	23,9	32,6	37,7	35,2	64,6	72,7	68,7
pH W	2,o3	2,o3	2,o3	14,1	14,1	14,1	31,1	31,1	31,1	11o	11o	11o
7 X	2,16	2,16	2,16	11,8	11,8	11,8	44,4	44,4	44,4	145	145	145
Y	2,18	2,18	2,18	11,3	12,7	12,o	46,6	46,6	46,6	167	186	177
Z	2,85	2,85	2,85	18,2	18,2	18,2	8o,8	8o,8	8o,8	3o4	395	35o

Tabelle 2

Halbwertszeiten der einzelnen Versuchsreihen in Stunden

1. Reihe: $T_{1/2}$ aus allen Meßpunkten

2. Reihe: $T_{1/2}$ der Mittelteile

3. Reihe: $T_{1/2}$ gemittelt aus 1. und 2. Reihe

tual großem Anfangsteil und kleinen Halbwertszeiten, wie z.B. bei pH 9 und 5o°C, wurde der Mittelteil durch Voringkubation einer größeren Menge bei entsprechenden Bedingungen in meßbare Bereiche gebracht und nach obigem Schema ausgewertet.

3.1.2. Halbwertszeiten der einzelnen Versuchsreihen

In Tabelle 2 sind die errechneten Halbwertszeiten der einzelnen Versuchsreihen eingetragen. Dabei gibt der erste Wert die Halbwertszeit aus allen Meßpunkten, der zweite nur die des Mittelteils und der dritte den Mittelwert aus beiden an.

3.2. pH-Abhängigkeit der Halbwertszeiten

Trägt man die Halbwertszeiten (Ordinate) gegenüber den pH-Werten des Puffers (Abszisse) in ein Diagramm ein, so stellt man fest, daß bei konstanter Temperatur und Ionenstärke ein pH-Optimum existiert, das für jeden Bereich charakteristisch ist (s.Abb.5, 6, 7 und 8). Der Berechnung des pH-Optimums wurde die Verteilungsfunktion zugrunde gelegt.

3.2.1. Ermittelung der pH-Optima

Verteilungsfunktion: $$T_{1/2} = \frac{a}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(pH - pHopt)^2}{2 \cdot \sigma^2}}$$

umgeformt: $$\ln T_{1/2} = -\frac{1}{2 \cdot \sigma^2} \cdot (pH - pHopt)^2 + (\ln a - \ln\sqrt{2\pi} - \ln\sigma)$$

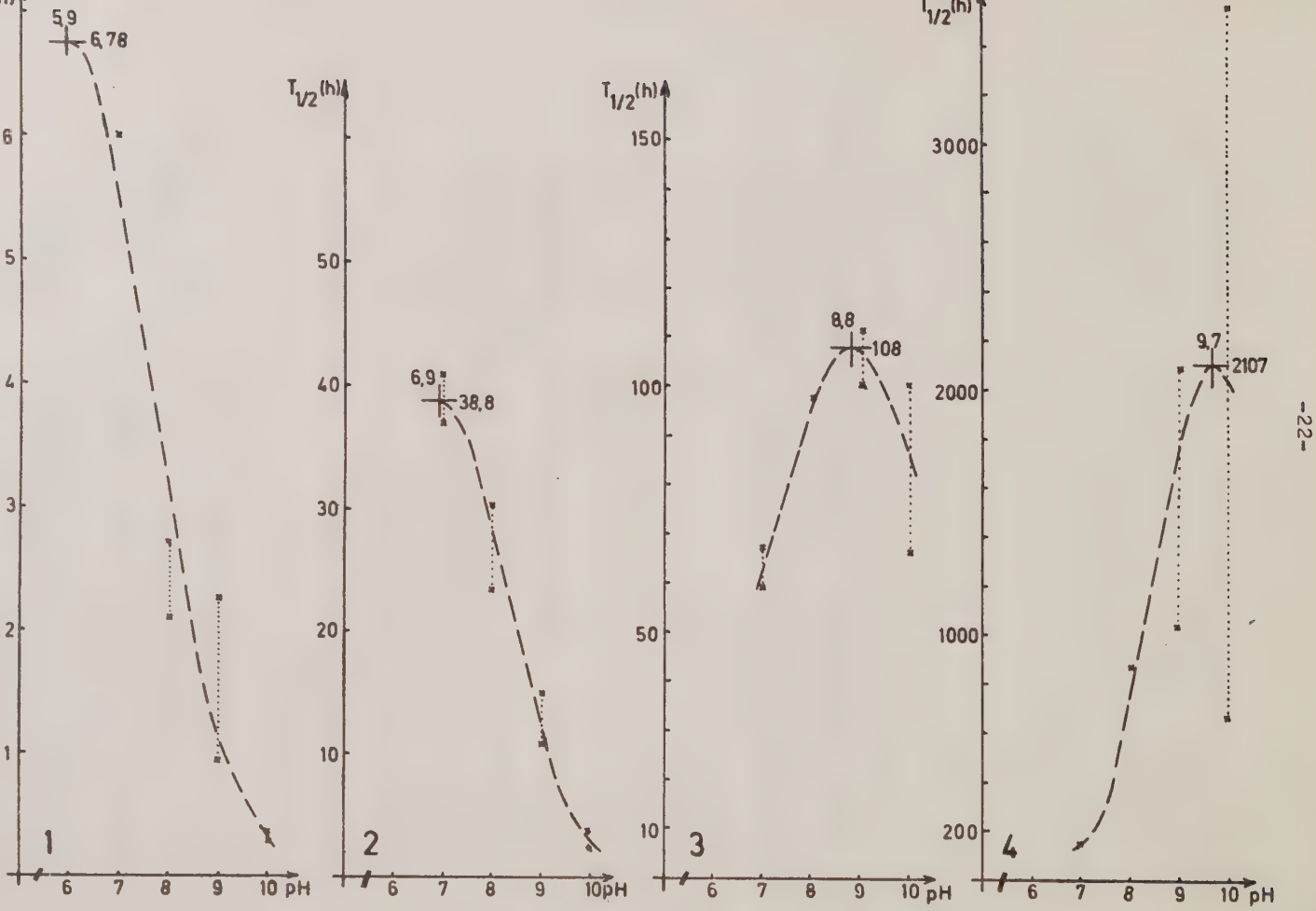

Abb.5: μ = 0,1 ; Temperaturbereich s. links unten

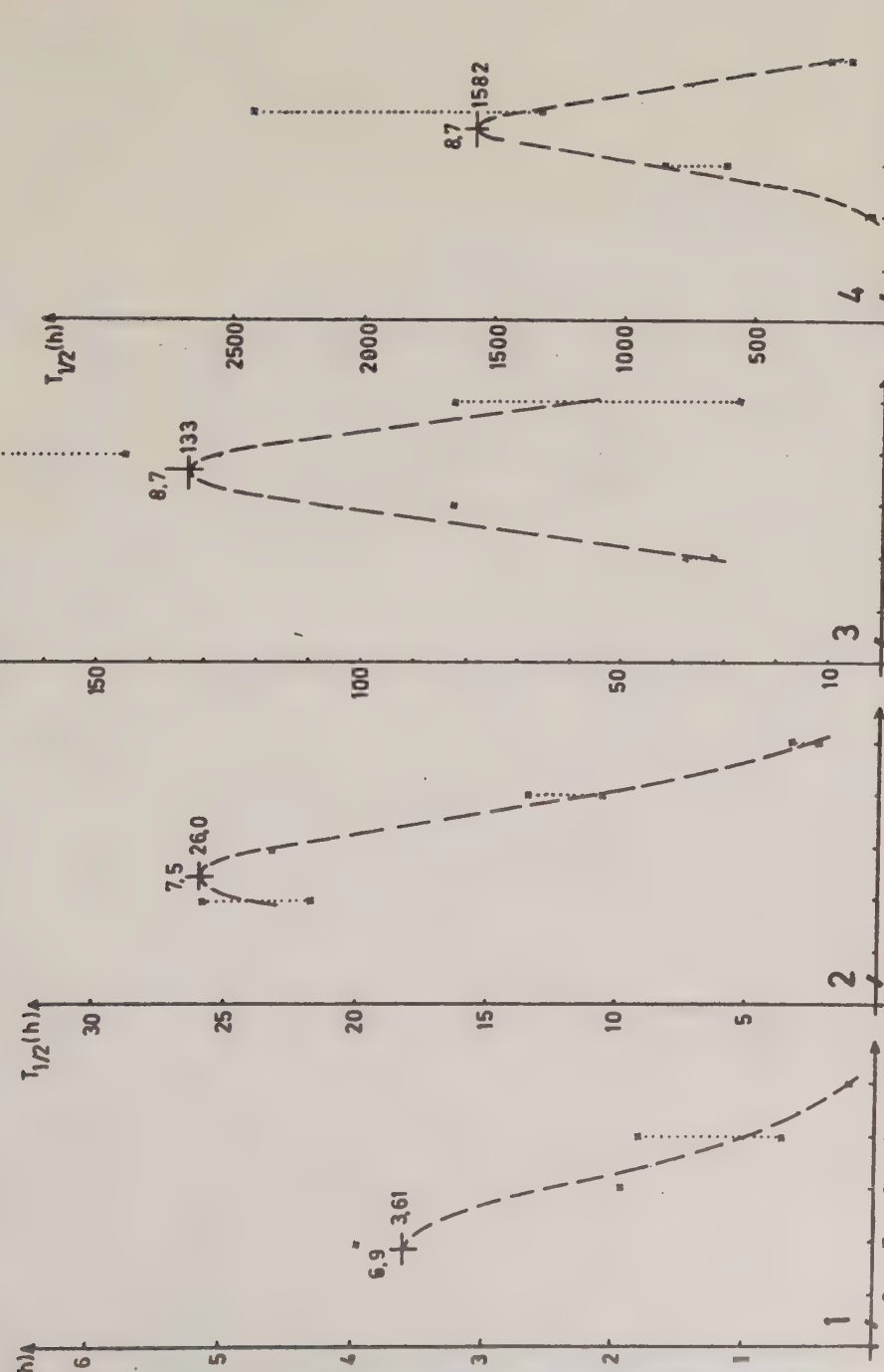

Abb.6: μ = o,2 ; Temperaturbereich s. links unten

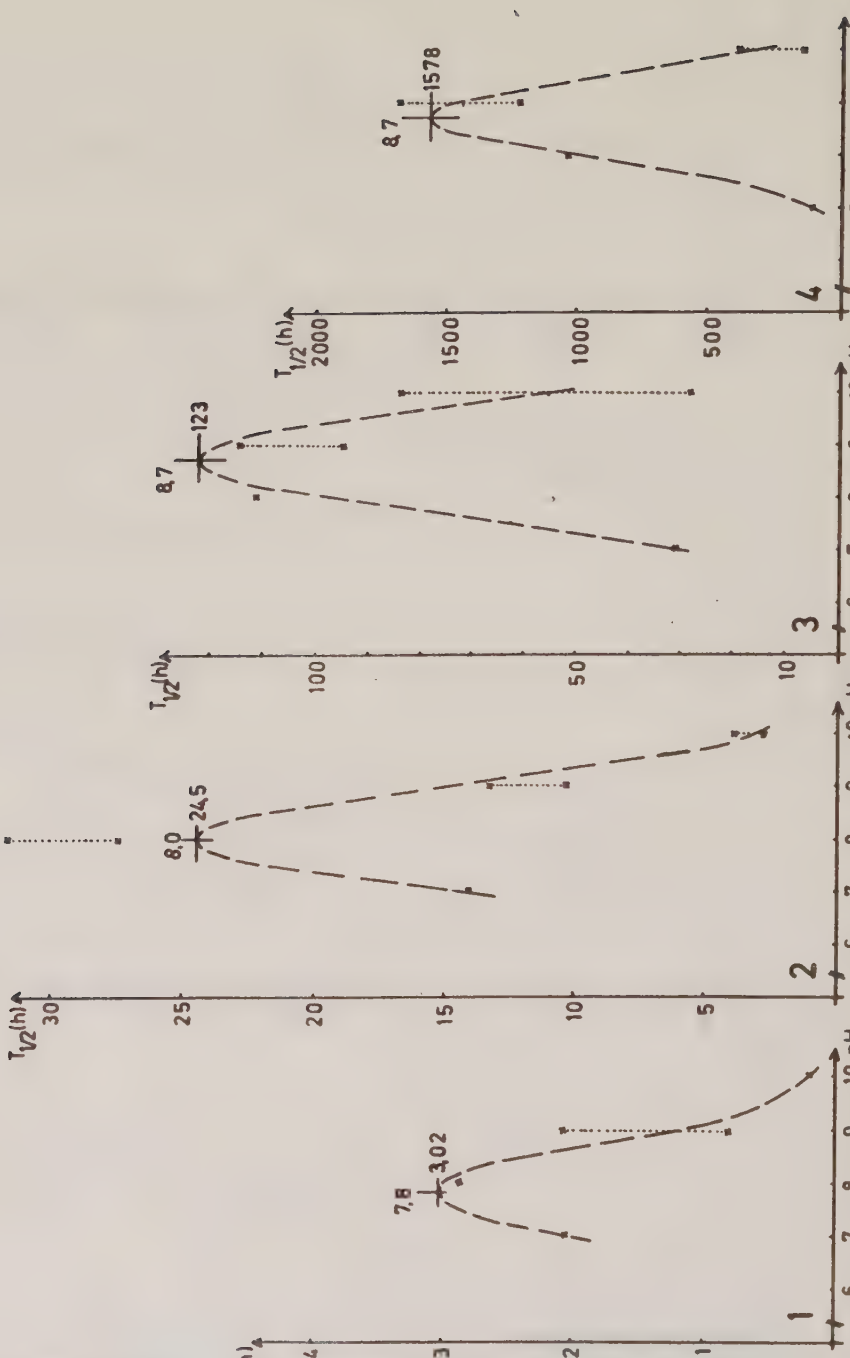

Abb.7: μ = 0,4 ; Temperaturbereich s. links unten

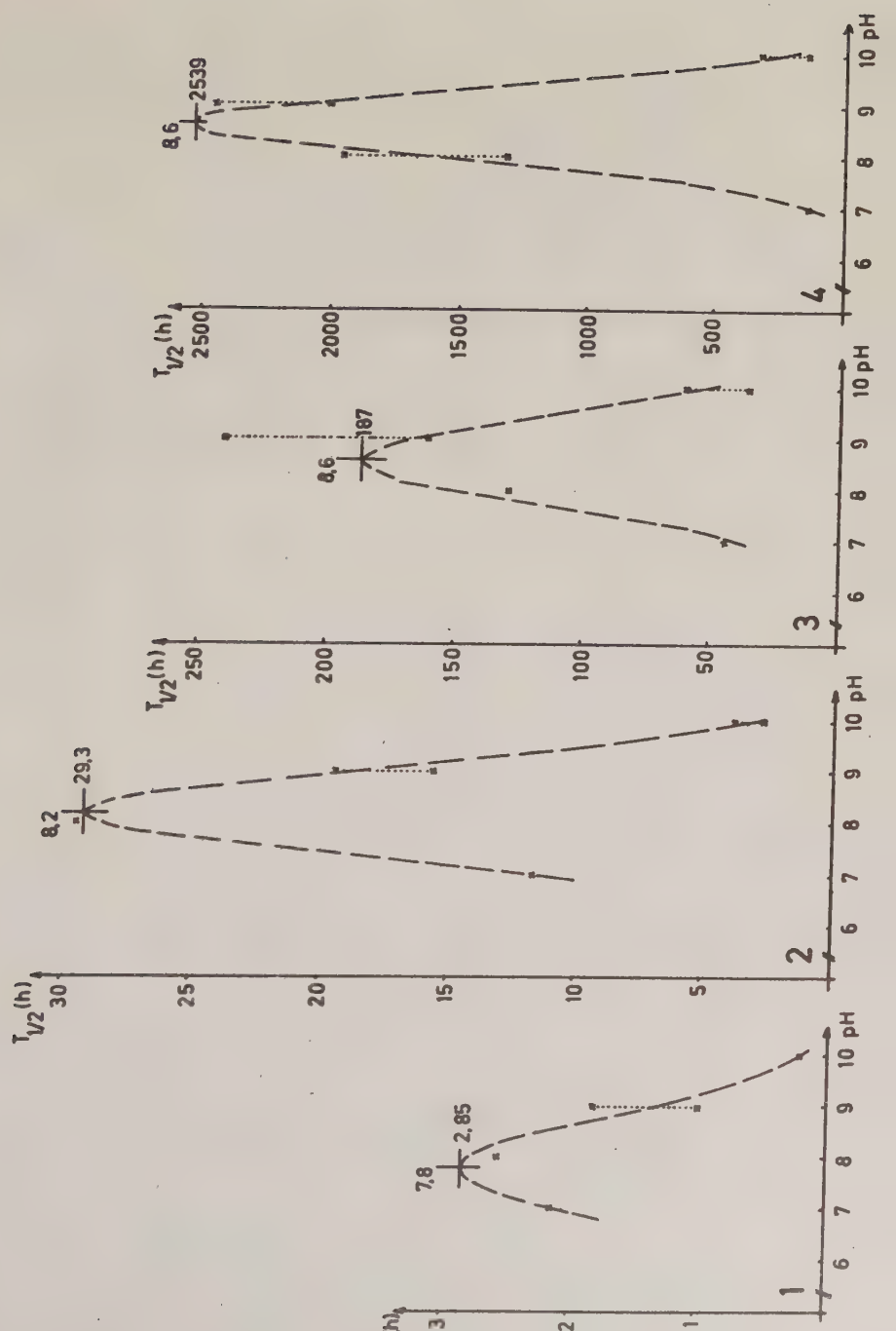

Abb.8: μ = o,8 ; Temperatur- bereich s. links unten

In nachfolgender Tabelle 3 sind die errechneten Werte pH-Optimum, $T_{1/2}$ im pH-Optimum, σ, a und die zugehörige Korrelation eingetragen.

Tabelle 4 gibt über die optimierten Halbwertszeiten bei den entsprechenden pH-Werten Auskunft.

μ	Temp.	pH-Opt.	$T_{1/2}$(pH-Opt.)	σ	a	corr
o,1	1	5,9	6,78	1,68	28,5	o,98
	2	6,9	38,8	1,39	135	1,oo
	3	8,8	1o8	1,74	469	1,oo
	4	9,7	21o7	1,19	6285	1,oo
o,2	1	6,9	3,61	1,3o	11,8	o,98
	2	7,5	26,o	1,19	77,7	1,oo
	3	8,7	133	1,o1	337	o,95
	4	8,7	1582	o,66	2617	o,98
o,4	1	7,8	3,o2	o,93	7,o4	1,oo
	2	8,o	24,5	o,99	6o,9	o,98
	3	8,7	123	1,o3	318	o,98
	4	8,7	1578	o,73	2887	1,oo
o,8	1	7,8	2,85	o,98	7,oo	1,oo
	2	8,2	29,3	o,87	63,9	1,oo
	3	8,6	187	o,9o	422	o,97
	4	8,6	2539	o,66	42oo	1,oo

Tabelle 3
(pH-Optima bei konstanter Temperatur und Ionenstärke)

3.2.2. pH-Optima in Abhängigkeit von Ionenstärke und Temperatur

Trägt man nun wiederum die Ionenstärke gegenüber ihren zugehörigen pH-Optima (Ordinate) bei den entsprechenden

A1	o,32	o,35	G1	1,6o	1,24	N1	2,4o	3,11	U1	5,98	5,47
A2	3,15	3,21	G2	13,o	12,4	N2	27,2	28,3	U2	39,o	38,7
A3	83,4	84,9	G3	1o7	1o7	N3	98,o	96,9	U3	63,5	63,1
A4	2116	2o41	G4	1558	1774	N4	879	763	U4	155	163
B1	o,19	o,21	H1	1,25	o,97	O1	1,93	2,52	V1	3,97	3,6o
B2	2,83	2,86	H2	12,1	11,8	O2	23,3	23,8	V2	23,9	23,8
B3	54,8	58,6	H3	161	127	O3	82,7	1o5	V3	35,2	32,7
B4	179	229	H4	1885	1427	O4	738	9o3	V4	68,7	58,o
C1	o,18	o,18	I1	1,42	1,31	P1	2,86	2,95	W1	2,o3	2,o9
C2	3,33	3,12	I2	11,8	14,7	P2	29,7	24,5	W2	14,1	14,7
C3	56,5	55,9	I3	1o5	118	P3	112	98,o	W3	31,1	31,9
C4	273	318	I4	1468	1449	P4	1o53	991	W4	11o	1o2
D1	o,22	o,22	K1	1,4o	1,34	R1	2,57	2,79	X1	2,16	2,o4
D2	3,34	3,37	K2	17,6	19,1	R2	29,6	28,5	X2	11,8	11,2
D3	48,6	56,5	K3	2o1	17o	R3	13o	15o	X3	44,4	39,2
D4	246	269	K4	2238	2114	R4	1618	1681	X4	145	135

Tabelle 4 (1. Reihe: $T_{1/2}$-Mittelwert; 2. Reihe: $T_{1/2}$ optimiert)

Temperaturen (Abszisse) wie in Abb.9 auf, so läßt sich ein Kurvenschnittpunkt ermitteln, der bei etwa 27°C und einem pH-Wert von 8,55 liegt.

Wählt man einen anderen Auftragungsmodus der drei Variablen wie in Abb.1o, so ist daraus ersichtlich, daß mit steigender Ionenstärke eine Konzentrierung der pH-Optima um den erwähnten pH 8,55 stattfindet.

Anders ausgedrückt heißt das, daß bei 27°C Lagerungstemperatur das pH-Optimum unabhängig von der Ionenstärke des Puffers, bzw. bei maximaler Ionenstärke unabhängig von der Lagerungstemperatur bei einem pH-Wert von 8,55 liegt.

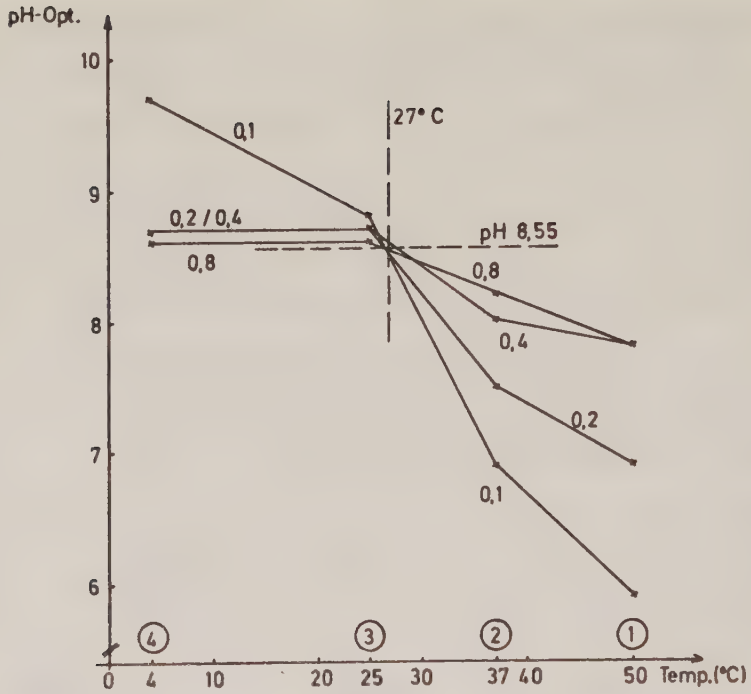

Abb.9

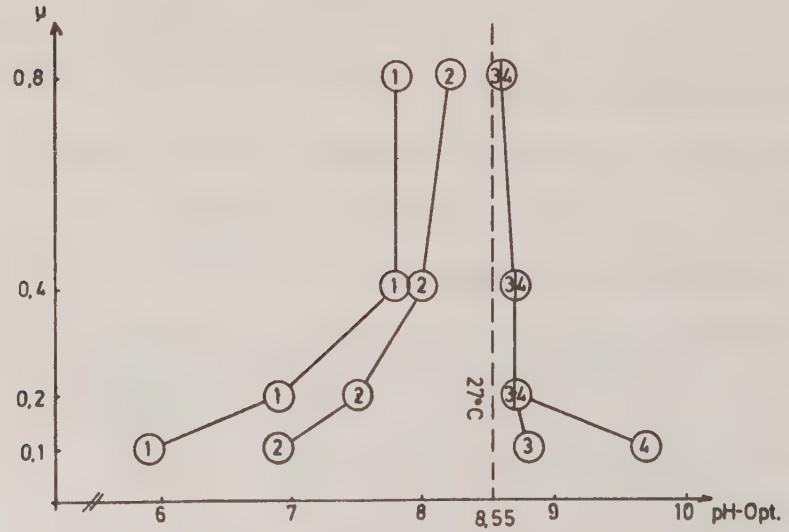

Abb.1o

Abb.9 u. 1o:pH-Optima bei entspr. Ionenstärken u. Temperaturen

Das alles sagt natürlich nichts über die Höhe der Halbwertszeit im jeweiligen pH-Optimum aus. So ist aus Tabelle 3 ersichtlich, daß z.B. $T_{1/2}$(pHopt) bei μ=o,1 , 5o°C und pH 5,9 mit 6,78 Std. größer ist als bei μ=o,8 , 5o°C und pH 7,8 mit 2,85 Std..

3.3. pH-Optimum-Halbwertszeiten im Vergleich zu Temperatur und Ionenstärke

3.3.1. pH-Optimum-Halbwertszeiten bei Änderung der Ionenstärke und konstanter Temperatur

Verfolgt man die pH-Optimum-Halbwertszeiten der Isothermen in Abhängigkeit von der Ionenstärke, so läßt sich ein Diagramm wie in Abb.11 erstellen. Besser noch kommt der Verlauf in Abb.12 zum Ausdruck, in der noch zusätzlich der Lage des pH-Optimums Rechnung getragen wurde. Wegen der großen Unterschiede der Halbwertszeiten wird in den beiden Abbildungen für jede Kurve eine eigene Einteilung der Ordinate vorgenommen.

Deutlich kommt dabei zum Ausdruck, daß im mittleren Ionenstärkenbereich ein Minimum an Stabilität zu verzeichnen ist, aber hingegen bei kleinen bzw. großen Ionenstärken die Stabilität stark zunimmt. Insbesondere hat es den Anschein, als ob die sehr hohen Ionenstärken asymptotisch dem pH 8,55 zustreben und durch den in diesem Bereich sehr steilen Anstieg auch hohe Halbwertszeiten erreichen würden.

Letztere Überlegung findet auch durch folgenden Sachverhalt Unterstützung. Betrachtet man Tabelle 3 und verfolgt

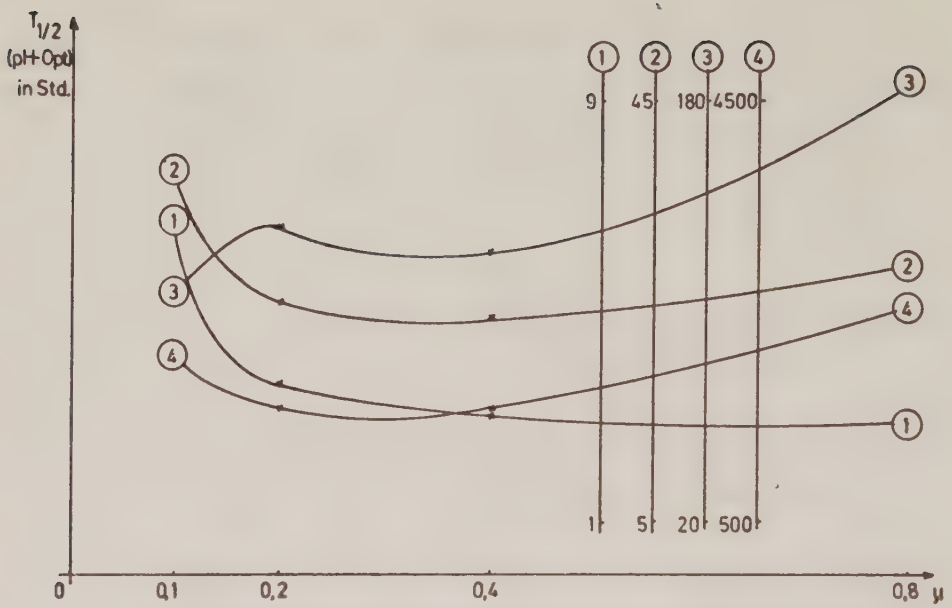

Abb.11: pH-Optimum-Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Ionenstärke bei konst. Temperatur

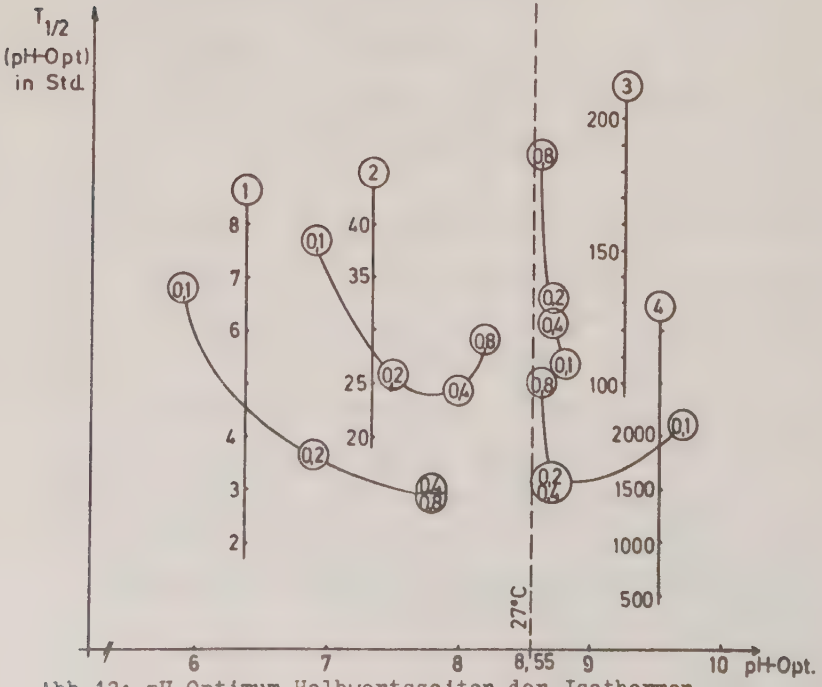

Abb.12: pH-Optimum-Halbwertszeiten der Isotherme

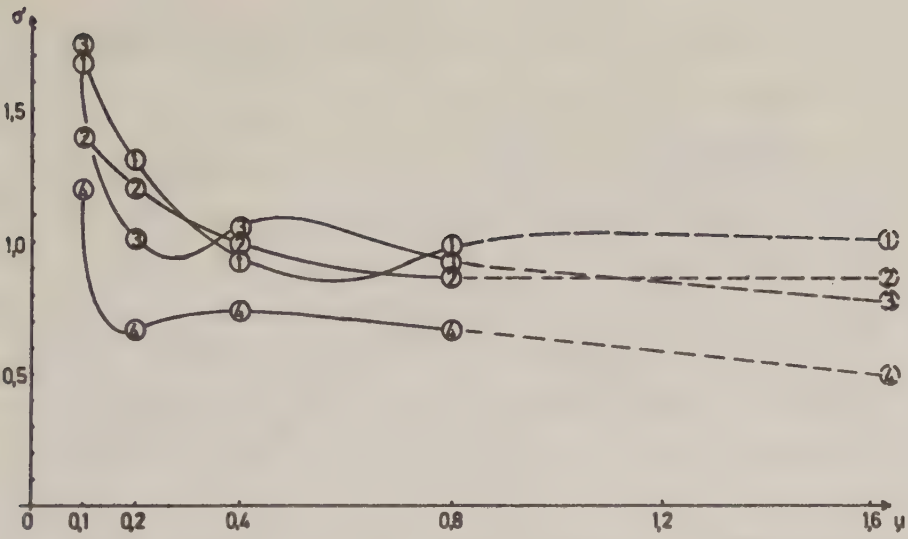

Abb.13: Verlauf von σ bei konst. Temperatur u. veränderter Ionenst.

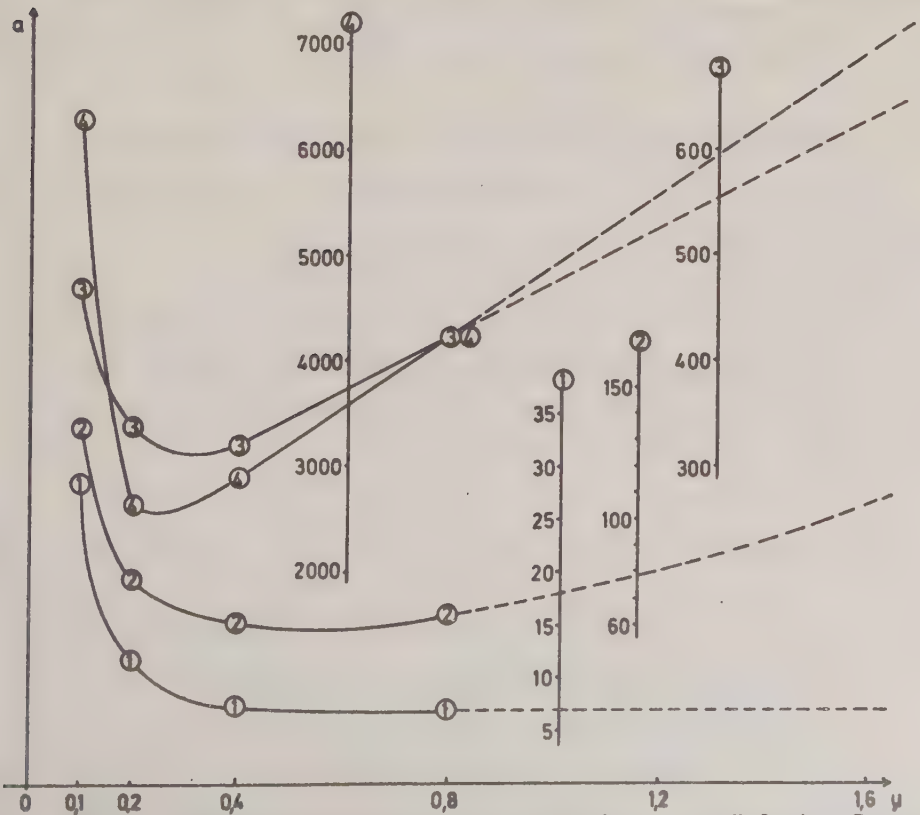

Abb.14: Verlauf von a bei konst. Temperatur u. veränderter Ionenst.

den Verlauf von σ und a und stellt diese Größen im Diagramm in Abhängigkeit zur Ionenstärke dar (Abb.13 und 14), so gewinnt man den Eindruck, daß mit Steigerung der Ionenstärke a größer und σ kleiner wird. Denn wenn man die Halbwertszeiten durch Einsetzen dieser Größen in den Therm $T_{1/2}(pHopt) = \frac{a}{\sigma \cdot \sqrt{2\pi}}$ (gemäß 3.2.1.) berechnet, so muß bei obiger Überlegung auch die Halbwertszeit steigen.

Mit kleiner werdendem σ steigt aber auch die pH-Empfindlichkeit der immobilisierten ADH, sodaß die in den Versuchsreihen bei μ = 1,2 bzw. μ = 1,6 teilweise niedrigeren Halbwertszeiten als bei μ = o,8 durchaus erklärbar sind.

3.3.2. Temperaturverlauf der pH-Optimumshalbwertszeiten bei konstanter Ionenstärke

Abbildung 15 gibt die Abhängigkeit der Halbwertszeit im pH-Optimum von der Inkubationstemperatur wieder. Dabei wurden die Halbwertszeiten im logarithmischen Maßstab, die Temperaturen als $\frac{1}{K}$ aufgetragen.

Es kann festgestellt werden, daß der Kurvenverlauf zwar nicht linear ist, daß jedoch mit steigender Ionenstärke der Verlauf steiler ist, und daß der Stabilitätsverlust pro 1K zwischen 1o% und 15% liegt.

3.4. Einfluß der Ionenart auf die Stabilität

Aus den Versuchsreihen F, M, T und Z geht hervor, daß auch die Ionenart einen Einfluß auf die Stabilität der immobilisierten ADH ausübt. So hat NaCl durchaus einen

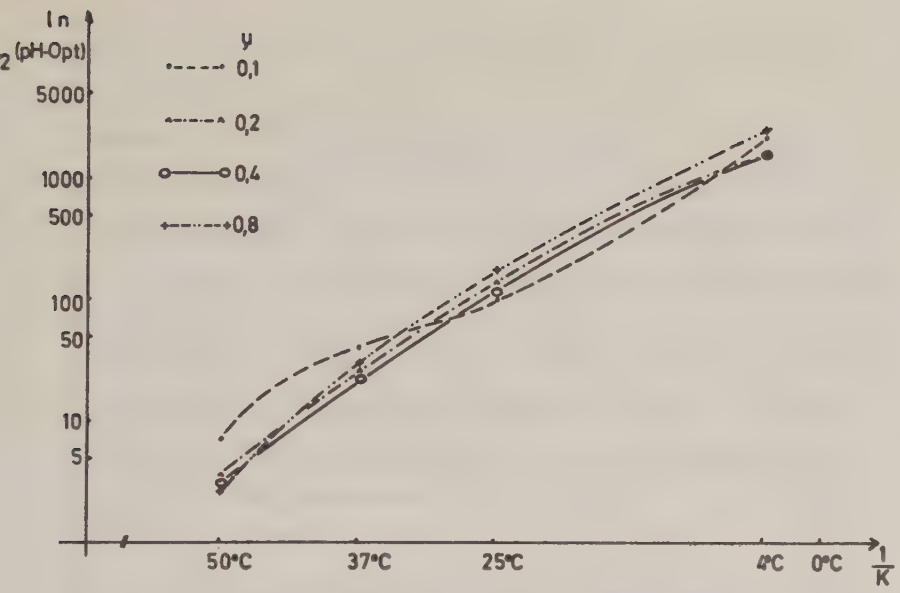

Abb.15: Einfluß der Temperatur auf die Stabilität bei entsprechenden Ionenstärken (Zum besseren Verständnis wurde die Abszisse mit ^{o}C gekennzeichnet)

stabilisierenden Effekt, was der Vergleich mit den Reihen C, I, P, W bzw. E, L, S, Y beweist.

3.5. Betriebsstabilität

Der Gehalt an Pyrophosphat in der Substratlösung ist mit 64 mM bei pH 9 mit einer Ionenstärke von etwa o,6 verbunden (s. Tab.1), ist also zwischen den Reihen I und K zu sehen.

Bei Testung der Betriebsstabilität unter den genormten Bedingungen wurde eine Halbwertszeit von etwa 11 Stunden gefunden. Vergleicht man diesen Wert mit I3 und K3 (1o5 bzw. 2o1 Stunden), so sieht man, daß dieser Wert nur etwa 1/1o bis 1/2o darstellt. Versuchsaufbau und -durchführung entsprechen der unter 2.2.1. bzw. 2.2.2. beschriebenen Weise, nur daß die Messung kontinuierlich über 5 Stunden fortgeführt wurde.

4. Diskussion

In der ersten ausführlichen Übersicht über immobilisierte Enzyme (9) wurde besonders auf die Verbesserung der Stabilität des Enzymproteins hingewiesen. Die Beispiele hierfür wurden überwiegend von immobilisierten Proteasen abgeleitet, wobei die Verhinderung der Autoproteolyse wahrscheinlich der entscheidende Faktor ist. Sehr viel weniger war über die Stabilität anderer Enzyme bekannt (1o). Es wird nur ein Beispiel eines Enzyms, das eine Mehrsubstratreaktion katalysiert, aufgeführt. Daher war die vorliegende Arbeit als Teil einer experimentellen Untersuchung gedacht, um die Abhängigkeiten des Stabilitätsverhaltens komplexerer Enzyme nach ihrer Immobilisierung zu erfassen.

Was Angaben über die Lagerstabilität der nativen ADH betrifft, so wird nicht einmal in den bekannten Präparationsvorschriften (5) dazu Stellung genommen. Lediglich Firmenangaben (s. 2.1.1.1.1.) geben einen ungefähren Anhaltspunkt darüber, jedoch lassen sich darin keine systematischen Untersuchungen erkennen. Einen Einblick in das Stabilitätsverhalten von nativer Hefe-ADH soll nun eine Untersuchung von HANSEN (Physiol.-Chem. Inst., Universität Würzburg) bringen, die parallel zu den hier wiedergegebenen Untersuchungen unternommen wurde.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun die Lagerstabilität immobilisierter Hefe-ADH systematisch untersucht werden, und zwar nicht durch Verwerfung eines nach bestimmter Zeit gemessenen Teils eines gelagerten Pools, sondern durch Testung einer vorgegebenen Menge unter wiederholtem Substrat-

kontakt bei der Messung und substratfreier Lagerung unter den getesteten Bedingungen.

Dazu wurden 96 Versuchsreihen (s. Tabelle 2) zusammengestellt, wobei aber nur 64 davon in die systematische Auswertung übernommen wurden (s. Tabelle 4). Obwohl bei dieser Zusammenstellung Gruppen entstehen, deren Daten scheinbar direkt miteinander vergleichbar sind, so z.B. A1, A2, A3 und A4 als Temperaturverlauf, oder N3, O3, P3, R3 und S3 als Verlauf bei Änderung der Ionenstärke, so ist dies eben gerade nicht der Fall. Denn, wie uns die Abbildungen 5 bis 8 zeigen, existieren pH-Optima, deren Lage sowohl von der Ionenstärke, als auch von der Lagerungstemperatur abhängen. Wenn man also die Halbwertszeiten wie in den beiden obigen Beispielen miteinander vergleicht, so wird der pH konstant gehalten und nur die Temperatur bzw. die Ionenstärke verändert. Damit ändert sich aber das zugehörige pH-Optimum, was alleine schon eine Änderung der Halbwertszeiten nach sich zieht. Damit wird ein solcher Vergleich unrichtig. Was also direkt miteinander vergleichbar ist, das sind eben nicht die einzelnen Daten aus den Tabellen 2 und 4, sondern nur die der pH-Optima, wie sie aus Tabelle 3 ersichtlich sind.

Der Aspekt der Abbildungen 5 bis 8 hat es nahe gelegt, die Berechnung der pH-Optima durch die allgemeine Verteilungsfunktion zu vollziehen. Die bei logarithmischer Eingabe der Halbwertszeiten (3. Reihe aus Tabelle 2) zugehörige Korrelation (s. Tabelle 3) zeigt, daß zumindest in diesem Bereich eine derartige Berechnung erlaubt ist. Tabelle 4 stellt die eingesetzten Werte denen der damit

berechneten gegenüber.

Natürlich erhält man außer der Halbwertszeit im pH-Optimum auch die zu jeder Kurve gehörigen Parameter σ und a. Dabei sagt a etwas über die Fläche unterhalb der Kurve und σ etwas über deren Steilheit, also über die pH-Empfindlichkeit in diesem Bereich aus. Je kleiner also σ ist, desto stärker werden sich pH-Verschiebungen in den Halbwertszeiten bemerkbar machen.

Betrachtet man die Lage der pH-Optima in bezug auf die Ionenstärke bzw. den Temperaturbereich (s. Abb.9 und 1o), so gilt, daß bei hohen Ionenstärken bei Temperaturänderungen das pH-Optimum in engen Grenzen um den pH 8,55 zu liegen kommt, daß aber hingegen bei niederen Ionenstärken eine große Variationsbreite, also eine hohe Temperaturempfindlichkeit vorliegt.

Sieht man sich die zugehörigen Halbwertszeiten der pH-Optima an (Abb.11 und 12), so fällt auf, daß bei konstanter Temperatur sowohl hohe, als auch niedere Ionenstärken einen stabilisierenden Einfluß ausüben und mittlere Ionenstärken ein Minimum an Stabilität bewirken. Dies könnte eventuell daran liegen, daß mit dem Einsalzen des Proteins ein Maximum an Löslichkeit, und damit ein Maximum an Irritabilität durch äußere Faktoren verbunden ist. Verminderte Löslichkeit würde also höhere Stabilität bedeuten. Insbesondere der steile Anstieg im Bereich der hohen Ionenstärken und den tieferen Temperaturen legt die Vermutung nahe, daß dort hohe Halbwertszeiten erreicht werden. Gleiches ist auch aus Abbildung 14 ersichtlich. Abbildung 13 zeigt uns aber, daß σ hier einem Minimum zustrebt, und daß diese

Halbwertszeiten nur bei exakter pH-Einstellung ermöglicht werden. Also große pH-Empfindlichkeit im hohen und geringere im niederen Ionenstärkenbereich.

Der Temperaturverlauf der pH-Optimum-Halbwertszeiten zeigt die im Wesentlichen schon bekannten Abhängigkeiten, nämlich daß bei nicht genau exponentiellem Verlauf eine Temperaturänderung von $1^{o}C$ eine Stabilitätsänderung von 1o% bis 15% bewirkt.

Unter Hinzuziehung der Abbildungen 13 und 14 sollte es durch a und σ nun möglich sein, auch über pH-Optimumshalbwertszeiten Aussagen zu machen, die nicht gemessen wurden. Über deren ungefähre Lage im pH-Bereich kann man sich durch die Abbildungen 9, 1o und 12 Klarheit verschaffen. Die Höhe der Halbwertszeit ist bei Festlegung von a und σ, auch bei Abweichung vom pH-Optimum durch die Funktion in 3.2.1. zu errechnen. Temperaturänderungen sind wie oben erwähnt zu berücksichtigen.

5. Zusammenfassung

Die Stabilität der enzymatischen (katalytischen) Aktivität immobilisierter Alkoholdehydrogenase aus Hefe wurde in Abhängigkeit von pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur untersucht.

Alkoholdehydrogenase wurde nach Bromcyanaktivierung von Agarose (Sepharose 4B) kovalent an den Träger gebunden.

Neben der allgemein zu erwartenden Abnahme der Stabilität mit steigenden Temperaturen wurde eine gegenseitige Abhängigkeit vom pH-Wert und der Ionenstärke beobachtet. Aus der Ionenstärke- und pH-Abhängigkeit ergibt sich ein mathematisch erfaßbares Modell, mit dessen Hilfe die günstigsten Bedingungen dem jeweiligen Anwendungszweck angepaßt werden können.

Definiert man anwendungsorientierte Lagerstabilität als die Bedingungen, unter denen eine für analytische oder präparative Anwendungen zusammengestellte Enzymreaktion (Säule, Rührgefäß) bis zum teilweisen Verlust der Enzymaktivität wiederverwendet werden kann, so folgt aus der vorliegenden Arbeit als günstige Bedingungen:

Immobilisierte ADH erreicht eine optimale Stabilität bei hoher Ionenstärke, hoher Pufferkapazität, einem pH-Wert von 8,55 und einem Zusatz von NaCl. Zu beachten sind ferner proteinstabilisierende Zusätze wie z.B. Mercaptoäthanol und zum Schutz gegen mikrobielle Kontamination Natriumazid oder andere bakterizide Substanzen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1 MANECKE, G.: Immobilisierte Enzyme; Chimia 28 (1974) Nr.9, Pp. 467-474

2 MOSBACH, K.: Immobilised Enzymes; Febs Letters, Vol.62 (1976), Pp. E 8o - E 93

3 SUND, H. and THEORELL, H.: The Enzymes, 2nd ed., Vol.7 (1963), Pp. 25-84

4 BRÄNDÉN, C.-I., JÖRNVALL, H., EKLUND, H. and FURUGREN, B.: The Enzymes, 3rd ed., Vol.11 (1975), Pp. 1o4-19o

5 RACKER, E.: Methods in Enzymology, Vol.1 (1955), Pp. 5oo-5o3

6 JOHNSON, D.B.: Biotechnol. and Bioeng., Vol.2o (1978), Pp. 1117-1123

7 AXEN, R. and ERNBACK, S.: Eur. J. Biochem. 18 (1971), Pp. 351-36o

8 JOHNSON, D.B.: Biotechnol. and Bioeng., Vol.2o (1978), Pp. 1125-1128

9 SILMAN, H.I. and KATCHALSKI, E.: Ann. Rev. Biochem. 35 (1966), Pp. 873-9o8

1o ZABORSKY, O.R.: Immobilised Enzymes; CRC-Press, Cleveland, Ohio (1973)

Herrn Prof. Dr. rer. nat. D. Palm bin ich für die Überlassung des Themas, sowie für seine freundliche Beratung bei aufgetretenen Problemen zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. E. Helmreich habe ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Physiologisch-Chemischen Institut zu danken.

LEBENSLAUF

Am 5. Mai 1955 wurde ich als zweites Kind des selbständigen Kaufmanns Werner Freise und seiner Ehefrau Johanna, geb. Eichner, in Regensburg geboren.

1961 wurde ich in die Engelburgerschule in Regensburg eingeschult, 1965 wechselte ich auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Goethe-Gymnasium über, an dem ich im Mai 1974 die Reifeprüfung ablegte.

Nach der Absolvierung des zweimonatigen Krankenpflegedienstes auf der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder und auf der internistischen Abteilung des Krankenhauses St. Josef in Regensburg, konnte ich mich für das Sommersemester 1975 an der Universität Würzburg für das Studienfach Humanmedizin einschreiben.

Im Frühjahr 1977 legte ich erfolgreich die ärztliche Vorprüfung ab und bewarb mich sogleich für die vorliegende Arbeit. Im Frühjahr 1978 bestand ich den ersten Teil der ärztlichen Prüfung.

Im März und April 1979 war ich Famulus bei dem Internisten Herrn Dr. med. H. Gigglberger in Regensburg.

Im Frühjahr 198o bestand ich den zweiten, im Frühjahr 1981 den dritten Teil der ärztlichen Prüfung. Die Approbation als Arzt wurde mir am 7. Mai 1981 erteilt.

Ulrich Freise